PCT

#### WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) (51) Internationale Patentklassifikation 7:

A61L 27/36

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/25839

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

11. Mai 2000 (11.05.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/08056

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1999 (25.10.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 49 984.1

29. Oktober 1998 (29.10.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): TU-TOGEN MEDICAL GMBH [DE/DE]; Industriestrasse 6, D-91077 Neunkirchen am Brand (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜBLER, Norbert [DE/DE]; Auf der Schanz 62, D-97076 Würzburg (DE).

(74) Anwalt: MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR; Postfach 22 16 11, D-80506 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, IL, KR, NO, TR, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR. GB. GR. IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

- (54) Title: METHOD FOR PREPARING BONE MATERIAL
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PRÄPARATION VON KNOCHENMATERIAL
- (57) Abstract

The invention relates to a method for preparing bone material. According to said method, the demineralized bone material is subjected to an autolytic decomposition and an extraction of its cellular components while at the same time its osteoinductive matrix proteins are maintained. To this end, the bone material is incubated in a phosphate buffer solution in combination with a mixture of enzyme inhibitors. The dwelling time in the buffer solution does not exceed 24 hours.

#### (57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial wird das demineralisierte Knochenmaterial einem autolytischen Abbau sowie einer Extraktion seiner zellulären Komponenten unterworfen unter gleichzeitiger Erhaltung seiner osteoinduktiven Matrixproteine. Dies wird durch Inkubation in einer Phosphatpufferlösug in Kombination mit einer Mischung aus Enzyminhibitoren erreicht, wobei die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Arménien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Ascrbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilicn	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	ıs	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vo
CA	Kanada	ΙT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JР	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU ·	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		•
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
cz	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dânemark	LK.	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

### Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial

5

Die Erfindung bezieht sich auf die Präparation und Gewinnung von demineralisiertem Knochenmaterial, das zur Wiederherstellung bei knöchernen Defekten in der Chirurgie geeignet ist.

10

15

Die Verwendbarkeit demineralisierten Knochenmaterials ist bereits bekannt. 1965 beschrieb M. R. Urist das osteoinduktive Potential von demineralisiertem Knochen nach intramuskulärer Implantation im Tierexperiment. Dieses Knochenmaterial enthält eine oder mehrere osteoinduktiv wirksame Substanzen wie z.B. die sogenannten bone morphogenetic proteins (BMPs), die eine Knochenregeneration in einem knöchernen Defekt stimulieren können (Lit. Urist, M.R.: Bone Formation by Autoinduction. Science 150: 893,1965.).

20 Eine Verbesserung dieses osteoinduktiven Knochenmaterials wurde über die Jahre hinweg schrittweise erreicht. Durch die Erkenntnis, daß eine im phosphatgepufferten Medium geführte Aktivierung von endogenen Knochenenzymen, die einen Abbau von osteoinduktiven Proteinen bewirken,

durch verschiedene Enzyminhibitoren wie Natriumazid, Jodessigsäure,

Jodacetamid, N-Ethylmaleinimid, Phenylmethyl-sulfonylfluorid und pChlorquecksilberbenzoat, unterdrückt werden kann, ohne gleichzeitig die
Autolyse von Knochenzellen zu beeinträchtigen, führte schließlich zu einem speziellen Herstellungsverfahren, mit dem ein sogenannter AAA-

Knochen, ein autolysierter, Antigen extrahierter, allogener Knochen, präpariert werden konnte (vgl. Kübler N., et al., J.Oral Maxillofac. Surg., 51: 1346-1357, 1993.). Dieser AAA-Knochen hat bei gleichzeitig reduzierter Allo-Antigenität osteoinduktive Eigenschaften. Die Reduzierung der antigenen Eigenschaften wird durch Behandlung der zellulären Bestandteile durch Autolyse sowie deren Extraktion mit Chloroform-Methanol erreicht. Hierbei wird Knochenmaterial, das einem Verfahren zur Herstellung als AAA-Knochen unterzogen wird, aus Verstorbenen gewonnen.

Die Gewinnung des Ausgangsmaterials für das demineralisierte Kno-10 chenmaterial aus Verstorbenen ist durch den Einfluß von nach dem Tode einsetzenden Zersetzungsvorgängen beschränkt. Diese Autolyse setzt unmittelbar post mortem ein und zerstört die für die beabsichtigte Wirkung des Ersatzmaterials erforderlichen Wirksubstanzen im entnommenen Knochen. Eine Gewinnung von geeignetem Knochen ist damit bislang nur 15 unmittelbar bzw. wenige Stunden post mortem möglich, wie z.B. aus Multiorganspendern. Die Zahl an Multiorganspendern ist sehr gering und erlaubt keine Gewinnung von Ausgangsmaterial für Material im Sinne der Erfindung mit dem Zwecke einer zuverlässigen und gesicherten Versorgung von Chirurgen. Andere Verstorbene kommen darüber hinaus als 20 Spender praktisch nicht in Frage, da das Einholen einer Erlaubnis zur Gewebeentnahme innerhalb des kurzen Zeitfensters für eine Gewebeentnahme nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Konzentration und die Wirksamkeit der das Knochenwachstum stimulierenden Substanzen unter bestimmten Umständen bis zu 24 Stunden post 25 mortem erhalten bleibt und dadurch eine Entnahme sowohl aus hirntoten Spendern wie aus normal Verstorbenen möglich ist.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zu schaffen, das den Heilungsprozeß nach einer Implantation beschleunigt.

- Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1
  und insbesondere dadurch, daß die Verweilzeit des Knochenmaterials in
  der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet. Überraschenderweise
  hat sich nämlich herausgestellt, daß die bislang als vorteilhaft angesehene
  Verweilzeit von 72 Stunden weder erforderlich noch vorteilhaft ist, um das
  Knochenmaterial zu präparieren und um die für den Heilungsprozeß wesentlichen BMPs zu erhalten. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird
  die Verträglichkeit des Knochenmaterials im lebenden Gewebe des Empfängers des Knochenimplantates verbessert und die Wirksamkeit bzw.
  Freisetzung der im knöchernen Träger enthaltenen Substanzen, die eine
  Knochenregeneration in einem Knochendefekt stimulieren können, werden
  verbessert, wodurch eine beschleunigte Heilung erreicht wird.
  - Erfindungsgemäß bleibt die natürlichen Knochensubstanz als Träger der Wirkstoffe und als Gerüstsubstanz zum biomechanisch korrekten Einbau weitgehend erhalten. Die vorliegende Erfindung verbessert die Behandlung des Leichenknochens jedoch derart, daß bestimmte Behandlungsschritte verkürzt und damit der Zeitverlauf des Abbaus der biologisch aktiven Inhaltsstoffe im Knochen vermindert werden.
- 25 Erfindungsgemäß besitzen die das Knochenwachstum stimulierenden, natürlichen Substanzen, die aus der Gerüstsubstanz des erfindungsgemäß behandelten Knochens erhalten werden, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber dem bisherigen Verfahren. Der Nachweis der verbesserten

Wirksamkeit erfolgt durch eine Implantationstest mit Ratten. Die Implantation des erfindungsgemäß behandelten Knochens in die Muskulatur von Ratten führt zur Erzeugung von Knochen- und Knorpelvorläuferzellen sowie zur Bildung von ausdifferenzierten Knochen- und Knorpelzellen. Die Bildung dieser Zellen ist semi-quantitativ auswertbar und ist durch die Menge bzw. durch den zeitlichen Anstieg der alkalischen Phosphataseaktivität ein Maß für die Aktivität der biologischen Inhaltsstoffe.

Weiter bleibt erfindungsgemäß die natürliche Knochensubstanz erhalten, die vom Empfängerorganismus als verträglich erkannt wird und im Verlaufe der Einheilung in körpereigenes Gewebe umgebaut wird. Ein wesentliches Element der Erfindung besteht dabei darin, daß die Chemikalien zur Bearbeitung des Ausgangsmaterials biologisch nicht stören und die Einheilung nicht behindern.

15

20

25

Gemäß der Erfindung bewirken die eingesetzten Chemikalien zur Demineralisierung der Gerüstsubstanz und zur Extraktion der zellulären Bestandteile gleichzeitig eine chemische Sterilisation, so daß eine akzidentelle Kontamination des Knochens durch Mikroben, entstanden im Verlaufe der Knochenentnahme oder während des Herstellungsverfahrens, durch das Behandlungsverfahren selbst beseitigt wird. Die Gewinnung des Knochens aus dem Leichenspender innerhalb einer 24-stündigen Frist erfolgt unter aseptischen Bedingungen. Damit kann eine Verkeimung durch Sporen im Spendergewebe ausgeschlossen werden. Eine Verkeimung durch vegetative Keime, wie sie in einem nachfolgenden Bearbeitungsverfahren zufällig oder durch nicht steril / aseptisch geführte Arbeitsgänge erfolgen kann, wird durch die verfahrensgemäße Anwendung der eingesetzten Chemikalien beseitigt. Eine terminale Sterilisation wie

z.B. durch Hitze oder Gas, wie sie zur Herstellung anderer pharmazeutischer Produkte eingesetzt wird, ist nicht obligatorisch, so daß die Inhaltsstoffe des demineralisierten Knochens vollständig erhalten werden können.

5

10

20

25

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in der Beschreibung und in den Unteransprüchen beschrieben.

So beträgt bei einer ersten vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verweilzeit nicht mehr als 10 Stunden, vorzugsweise etwa 6 Stunden. Durch eine solche, im Vergleich zum Stand der Technik drastisch reduzierte Verweilzeit in der Pufferlösung wird die biologische Aktivität des erhaltenen Knochenmaterials deutlich gesteigert, ohne daß es jedoch erforderlich oder vorteilhaft wäre, eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren zuzugeben. 15

Auch ist es vorteilhaft, wenn der Demineralisierung eine Entfettung vorausgeht. Hierbei ist jedoch eine Mischung aus Chloroform und Methanol als verwendetes Lösungsmittel physiologisch bedenklich, da bereits geringe Rückstände das Einheilungsverhalten beeinträchtigen können und darüber hinaus die Verwendungsmöglichkeit von Chloroform in einem pharmazeutischem Herstellungsverfahren aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen mit erheblichen Beschränkungen verbunden ist. Der Ersatz des vorbekannten Entfettungsmittelgemisches Chloroform / Methanol durch andere Entfettungsmittel, z.B. Methanol allein, Chloroform allein, Ethanol, Äther, Azeton und andere Niedrigsieder und Gemische daraus bevorzugt Äther, ermöglicht eine verbesserte, rückstandsfreie Entfernung aus dem

15

20

25

Knochengewebe und eine verbesserte Verträglichkeit des Knochenersatzmaterials.

Besonders vorteilhaft ist es ferner, wenn das erhaltene Knochenmaterial am Ende der Prozeßfolge einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird, da hierdurch ohne Einfluß auf die biologische Aktivität eine Sterilisierung des Materials erfolgen kann.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung beispielhaft anhand einer vorteilhaften Ausführungsvariante beschrieben.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial sowie der Herstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie wird zunächst humaner, kortikaler Knochen, z.B. vom Ferrur, Tibia, Humerus oder kortikaler Knochen des Beckenkamms sowie des Craniums von geeigneten Spendern unter sterilen Bedingungen innerhalb von 6 Stunden post mortem und bei -80°C gelagert. Der gefrorene Knochen wird zur Bearbeitung in sterilem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid aufgetaut. Das Natriumazid dient als Enzyminhibitor um einen Abbau der osteoinduktiven Knochenmatrixproteine zu unterbinden. Die Knochenenden bzw. Gelenkansätze werden entfernt und der Knochen wird befreit von anhaftendem, nicht ossärem Gewebe und eventuell vorhandenes Knochenmark wird entfernt. Für Zwischenlagerungen während dieses Vorgangs wird der Knochen in destilliertem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid, 2 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 0,1 mmol/l Benzamidin-Hydrochlorid bei 4°C gelagert und auf diese Weise eine enzymatische Aktivität unterbunden. Alternativ kann die Lagerung beispielsweise auch in 10 mmol/l Natriumazid und 3mmol/l N- Ethylmaleinimid bei 4°C erfolgen.

25

Anschließend erfolgt eine Entfettung in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur über etwa 4 Stunden.

Nach einer Verdampfungszeit (Evaporierungszeitraum) von etwa 1 Stunde wird der Knochen zur Demineralisation in 0,6 mol/l Salzsäure bei 4°C eingelegt. Der Grad der Demineralisation ist abhängig von der Zeitdauer und dem Verhältnis zwischen dem mineralischen Gewicht und dem Volumen der Salzsäure. Dauer der Salzsäurebehandlung und damit Grad der Demineralisation liegen zwischen wenigen Stunden für eine Oberflächendemineralisierung und bis zu 30 Stunden für eine vollständige Demineralisation. Dabei löst die Salzsäure auch säurelösliche Proteine heraus wie Knochen-Sialoprotein, Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin, und Thrombospondin. Die Behandlung mit Salzsäure ermöglicht die Diffusion der BMPs in das Empfängergewebe post implantauonem und erleichtert Osteoinduktion und Resorption durch Makrophagen und Osteoklasten.

Nach der Demineralisation wird der Knochen erneut einer Säuberung auf eventuelle Gewebereste auf der Knochenoberseite unterzogen und in sterilem, destilliertem Wasser bei 4°C für 30 - 60 Minuten gewaschen. Durch Inkubation in 0,1 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit 3 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid zur Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine wird ein autolytischer Abbau der Knochenzellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgt bei 37°C unter Schütteln über etwa 6 Stunden in einem Wasserbad. Ein Wechsel der Pufferlösung kann erfolgen. Anschließend wird der Knochen in sterilem, deionisiertem Wasser für 2 bis 4 Stunden bei 4°C gerührt. Das Wasser wird für diesen Vorgang zweimal gewechselt.

Es folgt eine Schrumpfung der Kollagenfibrillen und die Extraktion hochmolekularer Proteoglykane mittels 6 mol/l Lithiumchlorid sowie die Extraktion von Protein-Polysacchariden mit geringem Molekulargewicht wie Biglykanen, Dekorin, Fibromodulin etc. durch 0,3 mol/l Calciumchlorid. Die Lösung enthält 3 mmol/l Natriumazid und die Extraktion wird über 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Der Knochen wird anschließend in sterilem destillierten Wasser für 12 Stunden bei 4°C gewaschen, wobei ein mehrfacher Wasserwechsel durchgeführt wird. Lipide sowie Lipoproteine der Zellmembran werden über 24 Stunden mittels einer 1:1 Mischung aus Chloroform-Methanol extrahiert. Ein zusätzlicher Effekt dieser Behandlung besteht in der Inhibition sowie Extraktion endogener, BMPs abbauender Enzyme. Nach Abgießen der Chloroform-Methanollösung wird der Knochen unter sterilen Bedingungen getrocknet. Schließlich wird der Knochen wiederum mit sterilem, deionisierten Wasser für 4 Stunden bei 4°C gewaschen und anschließend tiefgefroren und danach für 10 Tage lyophilisiert und schließlich steril verpackt. Hieran kann sich noch eine Gamma-Sterilisation anschließen.

20

15

10

In Stichworten gestaltet sich das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren für Knochenstücke wie folgt:

- Bei -80°C tiefgefroren gelagerten Knochen in Aqua dest. mit 2,0 mM
  Natriumazid auftauen.
  - 2 Knochenenden entfernen.
  - 3 Knochen von Weichgeweben befreien.
  - 4 Knochenstücke mittels Kürette von Knochenmark befreien.

- 5 Knochen in gewünschte Größe sägen.
- Knochen mit starkem, kaltem Wasserstrahl von Knochenmark befreien, Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 2,0 mM Natriumazid 2,0 mM N-Ethylmaleinimid und 0,1 mM
- 5 Benzamidin-HCl lagern.
  - 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, 4 h.
  - 8 Evaporieren für ca 1 h.
  - Demineralisierung mit 0,6 M HCl bei 4°C für 2 bis 16 h je nach gewünschtem Demineralisierungsgrad (am nächsten Tag Röntgen-
- 10 kontrolle).

- Oberste Schicht des demineralisierten Knochens und noch anhaftendes Weichgewebe entfernen.
- 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4°C für 1 h.
- 12 Knochen für 6 h in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM Nethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
  - Mit Aqua dest, für 2-4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
- 14 Für 24 Std mit 6.0 M LiCl/0,3 M CaCl<sub>2</sub> mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
  - Mit Aqua dest. 12 bis 24 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
  - Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
  - 17 Evaporieren für ca. 2-3 h.
  - Mit sterilem Aqua dest. für 4 h bei 4 °C waschen, das Wasser zweimal wechseln.

- 19 Lyophilisieren für 10 Tage; anschliessend Sterilproben prüfen.
- 20 Knochenstücke steril verpacken.
- 21 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.
- 5 Es sei darauf hingewiesen, daß die oben genannten Schritte 10 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauscht werden können.

Ein Herstellungsverfahren für Knochenpulver gestaltet sich gemäß der Erfindung wie folgt:

10

25

- 1 Knochen in Aqua dest. Mit 2,0 mM Natriumazid (0,13 g auf 1 l) auftauen.
- 2 Knochen von Weichgewebe befreien.
- 3 Knochen in kleine Stücke sägen.
- 15 4 Knochenstücke von Knochenmark befreien und unter kaltem Wasser nochmals säubern.
  - Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 10,0 mM Natriumazid 3,0 mM N-Ethylmaleinimid lagern.
- 6 Mit der Knochenmühle unter Verwendung von flüssigem Stickstoff 20 grob mahlen (ca. 2,0 mm Korngröße).
  - 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, für 1 bis 4 h.
  - 8 Evaporieren für ca 1 h.
  - Auf die gewünschte Größe (ca 0,5 mm Korngröße) mahlen unter Kühlung, z.B. durch flüssigen Stickstoff.
    - Demineralisierung mit 0.6 N HCl bei 4°C über Nacht (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
    - 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4° C für 1 h.

10

20

- Pulver für 6 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-ethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37° C im Wasserbad inkubieren.
- Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid für 4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
  - Für 24 h mit 6,0 M LiCl /0,3 M CaCl<sub>2</sub> mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
- Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid den ganzen Tag bei 4°C waschen und Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
- Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
- 17 Evaporieren für ca 1 h.
- 15 18 Mit sterilem Aqua dest. für 1 h bei 4° C waschen.
  - 19 Lyophilisieren.
  - 20 Nach 10 Tagen Sterilproben prüfen.
  - 21 Pulver steril verpacken.
  - 22 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.

Auch hier sind die oben genannten Schritte 11 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauschbar.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen den Einfluß verschiedener Verfahrensparameter auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)).

Tabelle 1A zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphataseaktivität (AP)) nach 10- bzw. 15- tägiger Implantation sowie

der osteoinduktiven Potenz nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber Phosphatpuffer in Kombination mit den genannten Enzyminhibitoren (3,0 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid bei 37°C) während der Autolyse:

Tabelle 1A

AP (U) 10 Tage
$\overline{X} \pm SD(n)$
41.4 ± 5.7 (6)
:
22.5 ±4,9 (6)
14.6 ± 3.5 (6)
$5.5 \pm 1.2 (6)$

Wie Tabelle 1A zeigt, wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht vorteilhaft auf die Osteoblastenaktivität aus. Zudem kann durch eine Verringerung der bislang gewählten Einwirkzeit von 72 Stunden auf 6 Stunden eine Steigerung der Osteoblastenaktivität auf das über 6-fache erzielt werden (nach 15-tägiger Implantation).

Tabelle 1B zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)) nach 10- bzw. 15-tägiger Implantation sowie der osteo-induktiven Potenz nach 4- wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber der neutralen Phosphatpufferlösung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an Enzyminhibitoren:

Osteoinduktion Histologie 9/9 2/3 2/3 4.9 (5) 5.8 (5) 1.2 (6) 0.8 (5) 0.6 (6) 47.3 ± 23.1 (5)  $13.7 \pm 1.9 (6)$  $71.8 \pm 13.1 (4)$ 28.3 ± 6.8 (6)  $7.5 \pm 2.6 (6)$ AP (U) 15 Tage  $(9)6.6 \pm 0.9$  $12.2 \pm 3.1 (6)$  $\overline{X} \pm SD (n)$ 20.3 ± +1 22.5 ± 6.5 ± # 8.3 AP (U) 10 Tage 22,5 ±4.9 (5) 14,6 ±3,5 (6)  $5.5 \pm 1,2 (5)$  $\overline{X} \pm SD (n)$ Phosphat, pH 7,4 Einwirkzeit (Std) 0,1 mol/1 Na-168 168 6 24 72 7:2 24 24 9 00 mmol/l Natriumazid 1000 mmol/l Natriuma-10 mmol/l Natriumazid N-ethylmaleinimid N-ethylmaleinimid N-ethylmaleinimid Enzyminhibitoren Konzentration 300 mmol/l 30 mmol/l 3 mmol/1 zid

Tabelle 1B

Wie Tabelle 1B zeigt, wird die Osteoblastenaktivität durch eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren während der Autolyse in neutraler Phosphatpufferlösung nicht gesteigert. Auch wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht positiv auf die Osteoblastenaktivität (nach 15-tägiger Implantation) aus.

Tabelle 2 zeigt den Einfluß von Lösungsmittelgemischen, eingesetzt zur Entfettung und Chemosterilisation, auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP) und Osteoinduktion) nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten sowie der Chondroinduktion nach 14-tägiger Einwirkung auf neonatale Rattenmuskulatur in vitro:

Tabelle 2

Chemosterilisation 24 h			
mit 50% Methanol und	AP (U) 10 Tage	Histologie	
20%	$\overline{X} \pm SD (n)$	Osteoinduktion	Chondroinduktion in vitro
Chloroform	55.9 ±24.8 (6)	12/15	4/6
Aceton	10.3 ±2.8 (6)	12/22	1/3
Äther	18.2 ±4.7 (5)	11/16	8/8

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

#### 20 Ansprüche

- 1. Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zur Wiederherstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie, umfassend folgende Schritte:
  - Demineralisieren von vorzugsweise kortikalem
     Knochenmaterial,

5

10

15

 autolytischer Abbau der Knochenzellen des demineralisierten Knochenmaterials unter Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine durch Waschen in einer Phosphatpufferlösung unter Zuführung von Enzyminhibitoren,

dadurch gekennzeichnet, daß die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

- Verfahren nach Anspruch 1,
   dadurch gekennzeich net, daß
   die Verweilzeit nicht mehr als etwa 10 Stunden, vorzugsweise
   etwa 6 Stunden beträgt.
- Verfahren nach Anspruch 1,
   dadurch gekennzeichnet, daß
   der Demineralisierung eine Entfettung, vorzugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, vorausgeht.
  - 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Demineralisierung eine Chemosterilisation, vor-

zugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, anschließt.

- Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
   dadurch gekennzeichnet, daß
   die Methanolmischung neben Methanol Äther oder Chloroform
   aufweist.
- Verfahren nach Anspruch 1,
   dadurch gekennzeichnet, daß
   das erhaltene Knochenmaterial einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird.
- Verfahren nach Anspruch 1,
   dadurch gekennzeichnet, daß
   das Knochenmaferial vor der Demineralisierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen wird.
- 8. Verfahren nach Anspruch 1,
  20 dadurch gekennzeich net, daß
  das Knochenmaterial vor der Demineralisierung ohne Erhitzung
  über 40°C zu Pulver gemahlen wird.
- 9. Knochenmaterial, erhältlich durch ein Verfahren nach zumindest einem der vorstehenden Ansprüche.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter anal Application No PCT/EP 99/08056

A. CLASSI IPC 7	FICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/36			
According to	o international Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC		
<del></del>	SEARCHED			
Minimum do	cumentation searched (classification system followed by classification	on symbols)		
IPC 7	A61L			•
	the state of the s	ush dogumente ere ingh	ided in the fields con	vehod
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that s	uch documents are incit	gaed in the helds sea	irciea
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data ba	se and, where practical,	, search terms used)	
	•			4
	CONCERNO TO BE DELEVANT			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Category 3	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	evant passages		Relevant to claim No.
Category	Oracion of document, with indication, smoot appropriate, or no ter-	···		
х	US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12 May 1992 (1992-05-12)			1-5,9
Y	column 1, line 30 - line 48 column 5, line 34 -column 6, line	e 55		6-8
Υ	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12 December 1996 (1996-12-12) page 1, line 17 - line 31			6
	page 23, line 32 -page 24, line 6	)		
Y	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN 25 September 1984 (1984-09-25) column 2, line 38 - line 68 example 1	R) .		7,8
		-/	İ	
		-,		
	·			
<u> </u>	L			
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family	members are listed in	annex.
° Special ca	stegories of cited documents:	"T" later document pub	lished after the inter	national filing date
	ent defining the general state of the art which is not lered to be of particular relevance		d not in conflict with the difference of the dif	
	document but published on or after the international	"X" document of particu		
"L" docume	ant which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another	involve an inventiv	•	ument is taken alone
citatio	n or other special reason (as specified)	"Y" document of particular cannot be considered		entive step when the
other	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means		ination being obvious	
	ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	"&" document member	of the same patent is	ımily
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of	the international sear	ch report
9	February 2000	17/02/2	000	
Name and	mailing address of the ISA	Authorized officer		
	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (-31-70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl.	Diedere	n .l	
1	Env. / 121 70\ 240_2016	ו טוכעכוכ	11, ♥	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

inter. Inal Application No PCT/EP 99/08056

.,00111110	INTOIN) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
ategory :	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, vol. 12, no. 2, April 1985 (1985-04), pages 233-241, XP000874409 page 235, column 2, line 18 -page 236, column 2, line 9	
		·
		·
•		
	·	
ì		
		*
	·	
		·
•		
	•	

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inte: onal Application No PCT/EP 99/08056

Patent document cited in search repor	t	Publication date		atent family member(s)	Publication date
US 5112354	Α	12-05-1992	NONE		
WO 9639203	Α	12-12-1996	AU CA CN EP	6107496 A 2222626 A 1192700 A 0851772 A	24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998
US 4472840	Α	25-09-1984	US	4394370 A	19-07-1983

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter phales Aktenzeichen PCT/EP 99/08056

A. KLASS IPK 7	ifizierung des anmeldungsgegenstandes A61L27/36		
Nach der in	sternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla	assifikation und der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb	pole )	<del></del>
IPK 7	A61L		•
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s	oweit diese unter die recherchierten Gebiete	afallen
Während de	er Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (I	Name der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie		no der in Batracht kommenden Teile	Cata Assessab No.
Kategone	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	De der in Betracht kommenden 1eile	Betr. Anspruch Nr.
Х	US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12. Mai 1992 (1992-05-12)		1-5,9
Υ	Spalte 1, Zeile 30 - Zeile 48		6-8
	Spalte 5, Zeile 34 -Spalte 6, Ze <sup>-</sup>	ile 55	
Υ	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC)		6
	12. Dezember 1996 (1996-12-12)		-
ı	Seite 1, Zeile 17 - Zeile 31		
	Seite 23, Zeile 32 -Seite 24, Ze	ile 6	
Υ	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN	R)	7,8
	25. September 1984 (1984-09-25)		
	Spalte 2, Zeile 38 - Zeile 68		
	Beispiel 1		
	<del></del>	,	
	-	-/	
	ı		
	·		
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	X Siehe Anhang Patentfamilie	
	ehmen		
	Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen     intlichung, die den aligemeinen Stand der Technik definiert,	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht	worden ist und mit der
aber n	icht als besonders bedeutsam anzusehen ist	Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur Erfindung zugrundellegenden Prinzips	zum Verstandnis des der oder der ihr zugrundeliegenden
Anmel	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist	Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu	
echoin	ntlichung, die geeignet ist, einen Prloritätsanspruch zweifelhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	kann allein aufgrund dieser Veröffentlic	hung nicht als neu oder auf
andere	in im Rechercherbericht genannten Veröffentlichung belegt werden er die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu	tung; die beanspruchte Erfindung
ausgel	ührl)	werden, wenn die Veröffentlichung mit	einer oder mehreren anderen
eine B	ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, enutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann	Verbindung gebracht wird und
	ntlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	*&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben	
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Rec	herchenberichts
9	. Februar 2000	17/02/2000	
Name und P	ostanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk		
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,	Diederen, J	
	Fax: (+31-70) 340-3016	0.000.011, 0	

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte .onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

ategorie ·	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, Bd. 12, Nr. 2, April 1985 (1985-04), Seiten 233-241, XP000874409 Seite 235, Spalte 2, Zeile 18 -Seite 236, Spalte 2, Zeile 9	
	<del></del>	
	•	
	·	
		·
		·
		·
		-
		1

1

#### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichurwen, die zur seiben Patentfamilie gehören

Inter males Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
US 5112354	Α	12-05-1992	KEIN	Ε		
WO 9639203	A	12-12-1996	AU CA CN EP	6107496 A 2222626 A 1192700 A 0851772 A	24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998	
US 4472840	A	25-09-1984	US	4394370 A	19-07-1983	